



Universidad
Zaragoza

**CALIDAD EN LAS DETERMINACIONES
ANALÍTICAS DE AMINAS BIÓGENAS CON
IMÁGENES DIGITALES**

**QUALITY IN ANALYTICAL DETERMINATIONS OF
BIOGENIC AMINES BY DIGITAL IMAGES.**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
TRABAJO FIN DE GRADO**

LARA PÉREZ OCHOA

DIRECTOR: ÁNGEL LOPEZ MOLINERO

**FACULTAD DE CIENCIAS
Convocatoria de Junio de 2020**

ABSTRACT

This work represents a first step for the determination of biogenic amines on paper support on which a microfluidic circuit has been printed. The process allows reagent solutions and samples to be injected onto the paper, so that migrate to the reactive zone, where a colorimetric reaction occurs. The colour area is captured by digital cameras. The intensity of the RGB components determines the analyte content quantitatively. Mainly, the realization of the microchip circuit on chromatographic paper has been studied, which allows a directed microflow of aqueous solutions. Different circuit designs, printing modes and thermal treatments have been evaluated to favor the creation of deep hydrophobic channels in the paper support.

In the printing of the chips the preferential jobs in cutting plotters are mentioned, along with conventional laser printers. Whatman filter lab paper with three filter pore types and also Scharlab quality has been used. This last one has a lower thickness and a higher pore than the previous ones. After printing, the circuits have been heat treated to achieve melting and permeation of the waxes and polymers that make up the toner through the thickness of the paper. So hydrophobic channels are produced for the flow of aqueous reagent solutions. The thermal treatment has been systematized in two stages: 1- conditioning and 2- Permeation. Made with programmed heating oven. It is verified that the melting temperature must be higher than 160°C and maintained for 15 min. Other programs have also been studied. Which is in accordance with the characteristics of the thermal analysis of the toner, carried out by means of differential and gravimetric thermal analysis.

After printing the channels, the evolution and migration profiles of reference chromogenic solutions have been modified. These have been prepared with three type azo dyes (blue-yellow-red). The flow through the channels can be modified by the 'Lucas-Washburn' model. And it is shown that the migration time is proportional to the diffusion coefficient, and the radius of the channels.

With this work it has been possible to prepare circuits by means of a simple printing on filter paper, and in less than 15 min. They allow the flow of colorimetric solutions in a unidirectional way, with a path of up to 8 cm in less than 5 min. The procedure allowed the development of colorimetric reactions to determine biogenic amines using more simplified procedures than those applied up to now.

RESUMEN

Este trabajo supone un primer paso para la determinación de aminas biógenas en soporte de papel en el que se ha impreso un circuito de microfluídica. El procedimiento permite inyectar disoluciones de reactivos y muestras sobre el papel, para que migren hacia la zona reactiva, en la que se produce una reacción colorimétrica. La zona de color es captada mediante cámaras digitales. A través de la intensidad de los componentes RGB se determinan cuantitativamente el contenido de analito. Principalmente se ha estudiado la realización del circuito-microchip en papel cromatográfico que permite un microflujo direccionado de disoluciones acuosas. Se han evaluado diferentes diseños de circuitos, modos de impresión y tratamientos térmicos para favorecer la creación de canales hidrofóbicos profundos en el soporte de papel.

En la impresión de los chips se mencionan los trabajos preferentes en plotters de corte, junto con impresoras láser convencional. Se ha usado papel de laboratorio de filtración Whatman de tres tipos de poro de filtración y también calidad Scharlab. Ese último de espesor inferior y poro superior a los anteriores. Tras la impresión los circuitos se han tratado térmicamente para lograr la fusión y permeación de las ceras y polímeros que componen el tóner a través del espesor del papel. De modo que se produjeran canales hidrofóbicos para el flujo de disoluciones acuosas de reactivos. El tratamiento térmico se ha sistematizado en dos etapas: 1- acondicionamiento y 2- Permeación.

Realizado con horno de calentamiento programado. Se verifica que la temperatura de fusión debe de ser superior a 165°C y mantenida durante 15 min. Otros programas también se han estudiado. Lo que está de acuerdo con las características de los análisis térmicos del tóner, realizados mediante análisis térmico gravimétrico y diferencial.

Tras la impresión de los canales se han caracterizado los perfiles de evolución y migración de disoluciones cromogénicas de referencia. Estas se han preparado con tres colorantes azoicos tipo (azul-amarillo-rojo). El flujo a través de los canales puede ser descrito por el modelo de 'Lucas-Washburn'. Y se demuestra que el tiempo de migración es proporcional al coeficiente de difusión, y el radio de los canales.

Con este trabajo se han podido preparar circuitos mediante simple impresión en papel de filtro, y en menos de 15 min. En ellos se permite el flujo de disoluciones colorimétricas de modo unidireccional, con recorrido de hasta 8 cm en menos de 5 min. El procedimiento permitirá el desarrollo de reacciones colorimétricas de determinación de aminas biógenas mediante procedimientos más simplificados que los aplicados hasta este momento.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Imágenes digitales	1
1.2. Microfluídica y microfluídica en papel	1
1.3. Tóner de impresión.	2
1.4. Aminas biógenas –ABs- y reacciones colorimétricas de las que se parte	3
1.5. Planteamiento y desarrollo del TFG	4
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO	4
CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL	5
1. INSTRUMENTACION	5
1.1. Equipos y Materiales	5
1.2. Métodos de impresión	7
2. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS	8
2.1. Preparación disoluciones y papel	8
2.2. Procedimientos experimentales	10
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
1. OBTENCIÓN DE MICROCHIPS	13
1.1. Diseño e Impresión.	13
1.2. Métodos de calentamiento	16
1.3. Otros: piro-grabación, imanes de Nd de alta imantación y corte,	18
2. CARACTERIZACIÓN	19
2.1. Análisis Térmico de tóner mediante: TGA y DTA.	19
2.2. Profundización del tóner con microscopía óptica	21
2.3. Flujo capilar de una disolución mediante el modelo de ‘Lucas-Washbrun’	22
2.4. Lectura cromogénica mediante IMAGE J	23
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA	24
1. CONCLUSIÓN	24
2. BIBLIOGRAFÍA	24

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Imágenes digitales

La técnica conocida como Digital Image Based Methods, DIBM, o Digital Image Colorimetry, DIC, hace referencia a procedimientos de medida analíticos que utilizan lectura de imágenes obtenidas en dispositivos digitales. Pasa por un gran auge y permite alcanzar grandes niveles de eficacia y eficiencia. Nuestro grupo ha sido pionero en la implementación de estos sistemas¹.

En trabajos anteriores esta técnica la hemos aplicado a la determinación de aminos biogénicos, entre otras determinaciones².

Las cámaras de los ‘teléfonos-inteligentes-smartphones’ están formadas por ‘fotosensores’ de tipo CCD y CMOS que tienen superpuestos máscaras preparadas con filtros de color rojo, verde y azul (RGB), además de otros filtros para el rango del infrarrojo (IR) y componentes ópticos. Las imágenes digitales adquiridas pueden proporcionar información cuantitativa útil para la lectura de ensayos al analizar las intensidades de los ‘pixels’ RGB o la escala de grises³.

La respuesta de las cámaras anteriormente mencionadas también son función de la iluminación así como del modo de procesamiento de la información. En nuestro grupo se ha trabajado la influencia de la iluminación a través del uso de LEDs de distintos colores. Es importante el procesamiento de las imágenes, en este TFG se han realizado mediante programa informático, Image J, que se encarga de procesar la imagen descomponiéndola en los canales RGB.

1.2 Microfluídica y microfluídica en papel

Se puede entender como una técnica de manipulación de líquidos, o micro-líquidos, en la que mediante dispositivos con pequeños canales se produce el microflujo de pequeños volúmenes de fluidos. Los dispositivos son a modo de chips, o micro-chips, para el paso de líquidos favorecidos por procesos y flujos de capilaridad: lab on a chip. Estos sistemas se caracterizan materialmente por sus pequeñas dimensiones y están siendo desarrollados en plataformas de impresión versátiles como impresoras convencionales o impresoras 3D, con materiales diversos, como vidrio, polímeros-PMDS,...- en los que además de modular el transporte se pueden conseguir interacción química selectiva. Entre los soportes de preparación cabe mencionar el papel como material importante.

El desarrollo propiamente dicho de la microfluídica puede datarse desde los años 90. Desde entonces ha experimentado una gran atención y aplicación. Así se puede ver en la investigación y desarrollo en medicina, alimentos, medio-ambiente, entre otros. En ámbitos sanitarios se diseñan test de ensayo de alta eficacia y eficiencia. En la Química Analítica permite simplificar los procedimientos y favorece el desarrollo de métodos rápidos de análisis⁴.

En particular la microfluídica en papel, presenta un alto interés. Su fácil disponibilidad, calidad, bajo coste y manipulación ha favorecido la aparición de una importante línea de investigación: micro-paper based analytical devices⁵⁻⁶.

Los métodos para generar canales han sido descritos y pueden ser desde simple corte hasta impresión 3D o impresora convencional con tóner y tintas colorantes diversas, con diferentes soportes de papel⁷.

La muestra se carga en el papel hidrofílico. Los canales creados forman una barrera hidrofóbica con un material insoluble en medio acuoso a prueba de fugas para flujos de fluidos. No se requiere un sistema de bombeo ya que el flujo dentro del dispositivo es impulsado por la fuerza capilar por los poros del papel⁸.

En un circuito tipo, imprimido sobre papel cromatográfico, como el que hemos aplicado en este TFG, Figura 1, se puede describir el flujo capilar de una disolución mediante el modelo de ‘Lucas-Washburn’. La ecuación deduce el recorrido, L, de un fluido con tensión superficial γ , viscosidad μ , diámetro efectivo del canal r, y durante el tiempo t y con un ángulo de contacto entre el líquido y la superficie del papel ϕ :

$$L = \sqrt{\frac{\gamma r t \cos(\phi)}{2 \mu}}$$

La ecuación dimensional se describe en unidades:

$$L = \sqrt{\frac{\frac{Kg \cdot m \cdot s}{s^2}}{\frac{Kg}{m \cdot s}}} = m = longitud$$

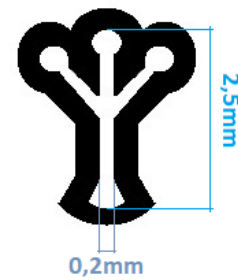


Figura 1: Diseño circuito chip.

1.3 Tóner de impresión

Es conocido el uso de la ‘impresión’ para generar dispositivos en metodología analítica. Así se producen electrodos impresos -ink printed electrodes- en metodología electroanalítica⁹. En el momento actual, se puede llevar a cabo la preparación de circuitos microfluídicos por simple impresión. En estos casos las características del tóner/tinta son determinantes para poder imprimir/producir canales de flujo para líquidos, de características hidrofóbicas. En esta línea se han usado tintas solidas con base de cera que luego son sometidas a calentamiento para que se introduzca la cera al interior del papel. Sin embargo, este procedimiento no es tan accesible como parece y apenas ha sido aplicado. Otros procedimientos, como los usos de sellos de impresión, que son impregnados de ceras han sido también propuestos pero necesitan de un diseño y elaboración previa, lo que requiere de tecnología muy específica y no suficientemente rápida y versátil¹⁰. En una línea de mayor simplificación, se ha publicado recientemente un método con impresión láser seguida de calentamiento para producir la permeación de las ceras que componen el toner¹¹.

El tóner se puede describir como una mezcla de aglomerantes poliméricos, pigmentos de color o bien negro carbón y ceras termoplásticas. También se componen con macropartículas de óxidos metálicos principalmente de óxidos de Fe, pero también de Si y de Ti, que les confiere propiedades magnéticas y de mejora de la impresión. Los aglomerantes poliméricos son principalmente copolímeros de poliestireno-acrilato. Una preparación tipo puede obtenerse con mezclas en las siguientes proporciones: sobre 200 ml de agua, se adiciona aglomerante (látex) de estireno-acrilato 24.5 g, colorante (1-5 g) y cera, del orden de 3g. A estas mezclas en disolución acuosa se añaden elementos de coagulación y partículas de óxidos metálicos¹².

La preparación de los circuitos se realiza en dos sencillos pasos. En primer lugar se imprime su figura con la forma deseada, usando una impresora láser, y posteriormente se calienta el papel impreso fundiendo el tóner. La fusión crea una barrera hidrofóbica estable y permanente al penetrar en el papel. Lo que permea a través de la sección transversal es la cera y la resina polimérica transparente. Pero para que esto se produzca es necesario calentar de modo que la cera pase a ser fluida y penetrar en el papel de modo rápido. Si bien las temperaturas de fusión de las ceras están en el orden de 65-70 °C, para que se formen canales hidrofóbicos el calentamiento debe ser superior a 165°C, para lograr el punto de reblandecimiento del polímero¹¹.

1.4 Aminas biógenas -ABs- y reacciones colorimétricas de las que se parte.

Son biomoléculas de peso molecular bajo que poseen un grupo amino como mínimo. Se producen como resultados de procesos naturales de descarboxilación-degradación de aminoácidos proteicos. Son especialmente relevantes en la calidad y olor de alimentos, como pescados, y otros.

Las ABs pueden clasificarse en los siguientes grupos según sea su estructura, Figura 2:

- Alifáticas: putrescina, espermita, cadaverina.
- Aromáticas: tiramina, feniletilamina.
- Heterocíclicas: histamina, triptamina.



Figura 2: Clasificación de ABs según su estructura.

Como se ha dicho anteriormente, las ABs están formadas por uno o más grupos amino por lo que otra clasificación de estas puede ser en función del número de estos grupos amino:

- Monoaminas: histamina, feniletilamina, tiramina.
- Diaminas: putrescina, cadaverina.
- Poliaminas: espermina, espermidina.

El aumento de interés por estudiar y controlar el contenido de AB en alimentos es debido a que su concentración se relaciona con la degradación de los alimentos y por tanto con la calidad y frescura de estos, aumentando la presencia de AB al aumentar la degradación, además, si estas se encuentran en altas dosis al ingerirlas presentan toxicidad¹³.

Métodos para la determinación cromogénica de las ABs se han desarrollado en nuestro grupo mediante DIC². Recientemente se acaba de publicar una determinación de las mismas¹⁴.

Estas reacciones colorimétricas se basan en reacciones enzimáticas, como las que produce la enzima DAO (diaminoxidasa) que cataliza la oxidación de ‘diaminas’ AB, como Putrescina o Cadaverina, según el siguiente proceso redox:



Figura 3: Reacción de oxidación de la Putrescina catalizada por la DAO².

Los productos de la reacción dan H₂O₂, NH₃ y un aldehído, en el caso de la Putrescina aminobutiraldehído y aminopentaldehído para Cadaverina. Los productos se detectan en una segunda reacción indicadora como indica la Figura 4 dando lugar a producto coloreado.

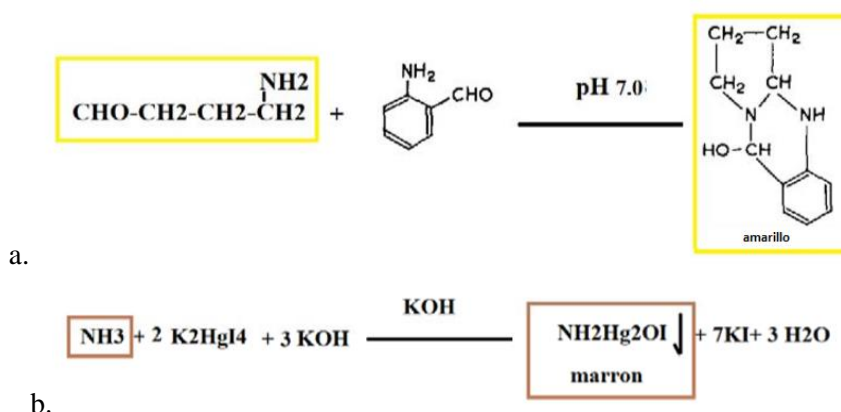


Figura 4: Reacciones colorimétricas. (a) Reacción de butiraldehído con 2-aminobenzaldehído. (b) Reacción de NH₃ con reactivo Nessler².

1.5 Planteamiento y desarrollo del TFG.

El planteamiento del TFG fue en un primer momento la puesta a punto de un método de preparación de circuitos de microfluídica que sirviera para implementar test de ensayo de ABs en una etapa posterior de una forma rápida y fácil de obtener.

El énfasis estaba en la preparación de los circuitos sobre papel y caracterización lo cual se ha logrado con éxito. Debido a la situación actual no se ha podido realizar la parte relacionada con el estudio de aminas biógenas por lo que el trabajo se centra en la obtención de los chips.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO

De acuerdo con el planteamiento del TFG los objetivos perseguidos, de modo concreto han sido:

- ✓ Desarrollar métodos de impresión de circuitos microfluídicos sobre papel de laboratorio.
- ✓ Estudiar, optimizar y caracterizar la producción de microchips por impresión.
- ✓ Caracterizar los procesos de migración de fluidos en los circuitos impresos.
- ✓ Evaluar la respuesta cromogénica de referencias cromáticas, mediante aplicaciones informáticas que descomponen los colores en coordenadas cromáticas RGB.

CAPÍTULO II. EXPERIMENTAL

1. INSTRUMENTACIÓN

1.1 Equipos y Materiales

1.1.1 Impresora láser y tóner

Impresora Sharp MX-M452N y Tóner negro MX-500GT

- Resolución de impresión: 600x600 ppp (puntos por pulgada)
- Tiempo de calentamiento (seg.): 20
- Peso del papel (g/m²): 56 – 209



1.1.2 Hornos de calentamiento y microscopio.

LPKF: Horno Zel flow RO2

- Horno para procesamiento de placas de circuitos.
- Equipado con tubos de 'infrarrojo' y aire de convección.
- Permite programación de calentamiento de modo sistemático y reproducible.

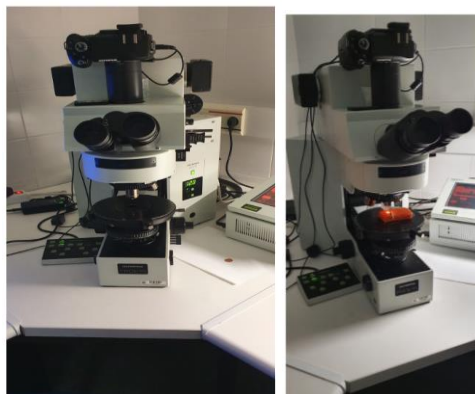


Estufa Heraus

- Estufa de calentamiento con termostato de control.

Microscopio: Olympus AX-70

- Equipado con cámara de fotografía digital Olympus E-33 de 7.5 Mpx
- Software de tratamiento de la imagen digital AnalySIS v.5.



Microscopio y microscopio con la hoja impresa (sección) sujeta a un porta de plastilina

1.1.3 Calorímetros

Calorímetro para TGA y DTA QA 600 de TA Instruments

- Permite medir la masa y la temperatura de la muestra, en atmosfera controlada y según programa de calentamiento térmico.



Calorímetro para DTS

- Permite la aplicación de calorimetría de barrido diferencial-DTS frente a patrón de referencia.

1.1.4 Cámara digital: teléfono móvil (dispositivo móvil)

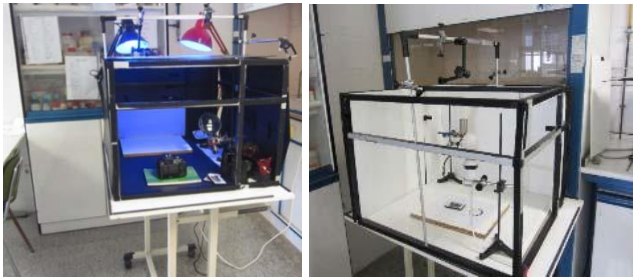
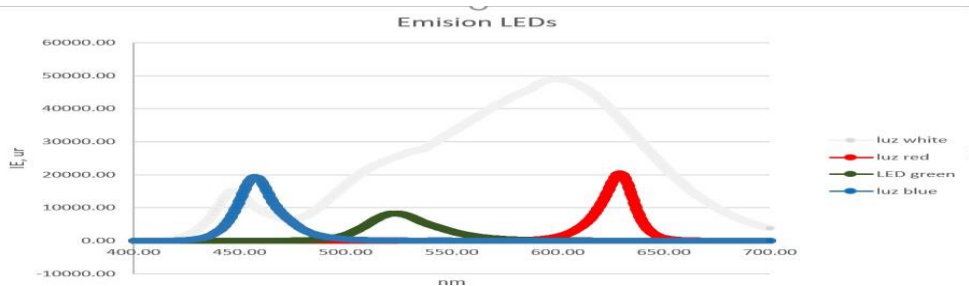
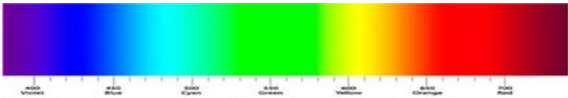
Xiaomi Mi 9T

- Sistema operativo: Android
- Resolución: 12 MP
- Lente de apertura: f/1.75
- Tiempo de exposición: 1/50
- Longitud focal: 4,77 mm
- Tamaño imágenes: 3000 × 4000px
- Formato: JPG



1.2 Materiales de laboratorio: destacados en el método

- 1. Micropipetas Pipet-Lite ‘RAININ’ 5-50 µl, 20-200 µl, 100 µl – 1 ml y 0,5-5 ml.
- 2. Eppendorf de 2 ml.
- 3. Cubetas espectrofotométricas de plexiglass de 3,5 ml

“Cámara de iluminación”:			
			
ILUMINANTES: Lámparas LED			
LED Colores EGLO RGB E27 : REGULABLE A 16 COLORES		Características LED: 6 WATT, 3000K, WARM WHITE	
Panchromatic Warm White	Monochrome- Red emission	Monochrome- Green	Monochrome- Blue
			
Espectros de emisión de iluminantes LEDs			
Espectro de la zona visible, con el reconocimiento de las bandas-canales de color.			
			

2. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS

2.1. Preparación de disoluciones y papel

Todos los reactivos fueron de grado analítico. El agua desionizada fue obtenida de un sistema convencional de purificación de agua destilada.

2.1.1 *Disolución patrón de colorante alimentario*

Se emplearon tres colorantes alimentarios de la marca Vahiné perteneciente al grupo McCormic Inc, Figura 5. Estos se compraron en un supermercado y están disponibles como disolución en tubos de PE. Los colores fueron rojo, amarillo y azul, con distintas percepciones y características moleculares.

En la formulación comercial, además de los colorantes se tiene: agua, ácido cítrico como acidulante, Sorbato de Potasio como conservador (E202).



Figura 5: Disoluciones patrón de colorantes alimentarios.

Disoluciones diluidas de colorantes se prepararon por simple dilución en agua: 1 vol de disolución colorante patrón / 7 vol de agua desionizada. Se prepararon de manera previa antes del uso.

En los experimentos de movilidad se inyectaron en los chips volúmenes de entre 5-8 µl de las disoluciones diluidas.

El colorante rojo, Azorrubina E112, es de tipo 'azoico'. Derivado de la condensación de dos moléculas de Naftaleno. Tiene grupos sulfonato que aumentan su polaridad y mejoran la solubilidad en medio acuoso.

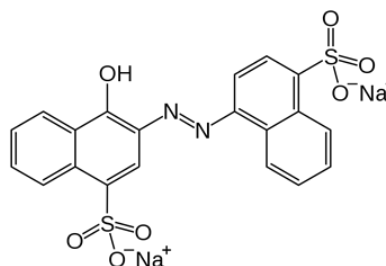


Figura 6: Fórmula Azorrubina.

El colorante amarillo es Tartrazina, E102, típico en industria alimentaria. Es también derivado azoico, con grupos sulfonato que aumenta su solubilidad en disolventes polares.

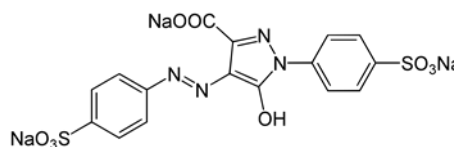


Figura 7: Fórmula Tartrazina

El colorante Azul Brillante FPD, E133, en forma de sal sódica, es muy soluble en agua. Se obtiene de hidrocarburos aromáticos del petróleo, que es empleado también en la industria cosmética.

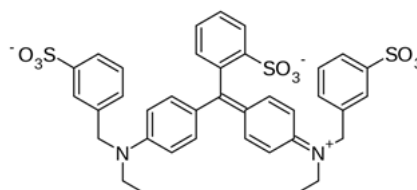


Figura 8: Fórmula Azul Brillante FPD.

El Sorbato de Potasio E202 es un conservante, fungicida y bactericida con una elevada eficacia y seguridad que se emplea en alimentación, cosmética y productos farmacéuticos. Puede retrasar o prevenir el desarrollo de microorganismos así como preservar características como el color, sabor o textura.

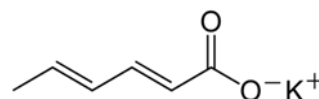


Figura 9: Fórmula Sorbato de Potasio.

El ácido cítrico utilizado en disolución actúa como tamponador, en este caso disminuyendo el pH. Lo que incrementa el tiempo de conservación de los alimentos y reduce el desarrollo de microorganismos. Otro uso de este es como antioxidante ya que mantiene la calidad de los alimentos durante más tiempo.

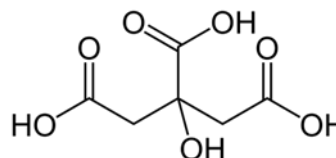


Figura 10: Fórmula Ácido cítrico.

2.1.2 Papel de Filtro

Papel de filtro Whatman de dos tipos de gramaje y tamaño de poro: grade 1-4 y también Resma de papel de Scharlab. Disponible en hoja de tamaño: 460x570 mm. Las características se dan en la siguiente tabla. Las hojas comerciales se cortan a medida de DIN A4 para su impresión directa en impresora.

Whatman Grado	Tipo de filtración Tamaño de paso de partículas µm	Velocidad de flujo	Espesor, µm	*Tiempo de filtración, s	Gramaje, g/m ²
1	< 11	Medio	180	150	88
4	20-25	Muy rápido	205	37	96
Scharlab	-	-	< 180	-	75

*Tiempo de filtración, Herzberg: se mide como el tiempo requerido para filtrar 10 ml de agua destilada a 20 ° C a través de un filtro de disco completamente humedecido por gravedad con un diámetro de 110 mm plegado en cuartos. Se expresa en segundos (por mm).

Tabla 1: Propiedades distintos papeles de filtro.

Describimos los usos de los papeles de filtro. El Whatman Grado 1 es el más utilizado, se emplea para trabajos rutinarios de laboratorio como control de la contaminación atmosférica, separación analítica de precipitados o análisis de suelos. Por otro lado, el papel Whatman de Grado 4 es extremadamente rápido con capacidad retentiva excelente para las grandes partículas o precipitados gelatinoso. Es utilizado cuando se necesita velocidad de flujo alta para el control de contaminantes atmosféricos donde la recuperación de partículas finas no es crítica, otros usos son como filtro rápido en rutinas de limpieza de fluidos biológicos o extractos orgánicos.

El papel Resma-Scharlab empleado se utiliza normalmente como hoja de protección en la superficie de trabajo para absorber salpicaduras y amortiguar derrames de disoluciones líquidas por lo que la casa comercial no indica las características que faltan en la tabla anterior.

2.2. Procedimientos experimentales

2.2.1 Diseño de circuito

El diseño-dibujo base de los microcircuitos es el mostrado en la Figura 11 con las dimensiones:

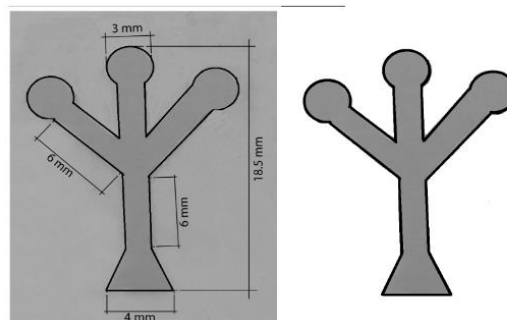


Figura 11: Diseño inicial chip.

El dibujo se realiza mediante la aplicación de Microsoft-Paint. Se seleccionan medidas en mm, con anchur de la línea inicialmente de 0,1mm. En la optimización del diseño se modificaron los grosores de las líneas según conveniencia de modo que según el grosor del borde se controlan las fugas de la disolución: No obstante hay que señalar que la efectividad de la barrera del chip depende también de la temperatura de calentamiento. Así mismo, y dado que la impresión del tóner no es homogénea, se producen imperfecciones y escapes de fluido. Al ir aumentando el grosor del borde se refuerza la barrera del chip haciendo más difícil la posibilidad de fugas.

En la Figura 12 se dan las condiciones para el trabajo y la impresión.

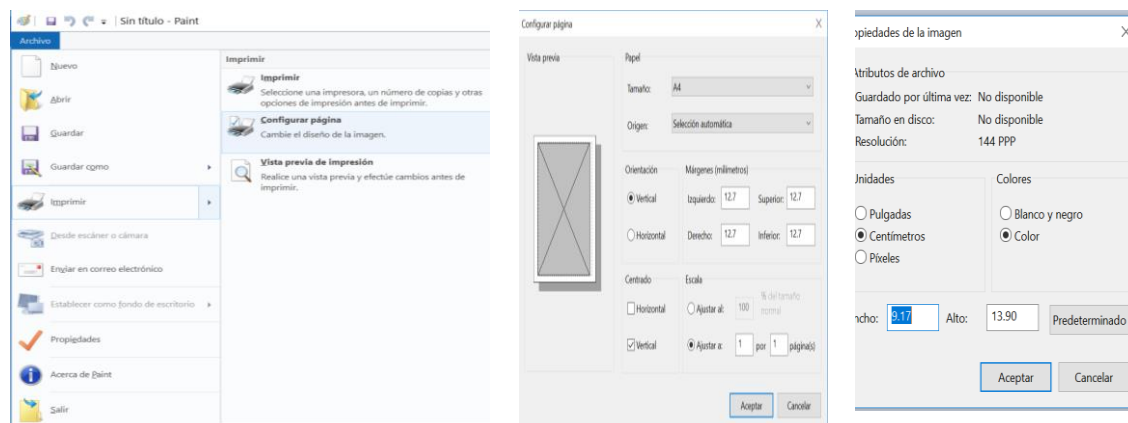


Figura 12: Condiciones de impresión en Paint.

2.2.2 Impresión tipo

El microcircuito dibujado se imprimió sobre un papel de filtro con impresora láser.

Se realizaron distintos tipos de impresión y así mismo una vez impresos se sometieron a diferentes temperaturas de calentamiento. Se evaluaron inyectando como mínimo en cada circuito 5 μ l de disolución de colorante. Principalmente se emplearon los diseños presentados en las Figuras 13 y 14. Se trabajan dos tipos: un chip sobre fondo negro y otro en fondo blanco modificando el grosor de la figura. Grosor tipo es x7, 0,7mm, en algunos experimentos bastó con un grosor de x5 para retener disolución efectivamente.

A partir de estos se realizaron impresiones a una cara con estos dos tipos de diseño y también re-impresión a doble cara. Al imprimir en doble cara se produce un desplazamiento de las imágenes obtenidas ya que las impresoras tienen un desfase produciendo que no coincidan exactamente los circuitos por ambas caras.



Figura 13: Circuito impreso con líneas de grosor variable y optimizado, sobre fondo blanco.

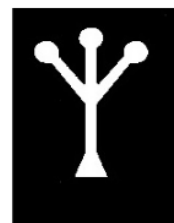


Figura 14: Circuito impreso sobre fondo negro

2.2.3 Lectura de colores

Las imágenes obtenidas se pasan al ordenador en formatos "raw y jpg". Mediante el programa Image J se mide la luminosidad de cada canal RGB en una escala de 0 (negro absoluto) a 255 (blanco absoluto). Para ello se utiliza la herramienta de 'Color Histogram' la cual nos da el histograma de color con los datos de media, moda y desviación estándar de cada color en esa región:

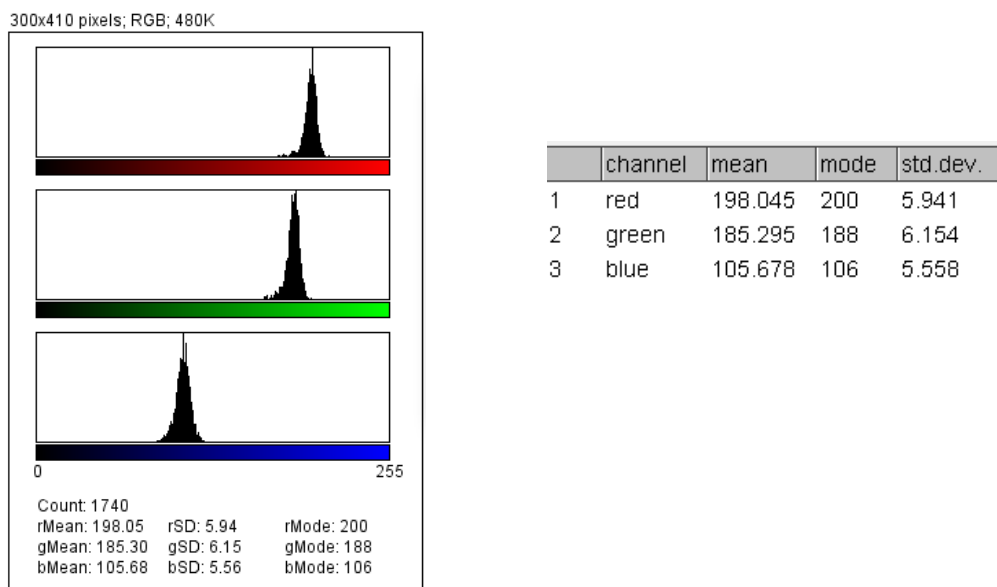


Gráfico 1: Ejemplo histograma de color con ImageJ.

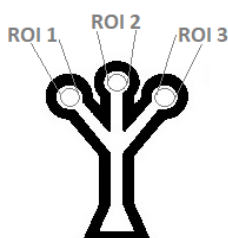


Figura 15: Zonas ROI del chip.

La lectura final en nuestros estudios es el resultado de la medida de 300x410 píxeles en la región de interés (ROI) en cada una de las tres zonas de detección del chip.

2.2.4 *Análisis Térmico*

El estudio termo-gravimétrico TGA-DTA del tóner se realiza sobre una muestra de peso (tipo) 4,70g a la que se le aplica un programa de calentamiento desde 27°C hasta 290°C con velocidad de calentamiento de 16°/min utilizando un calorímetro QA 600 de TA instruments. La muestra se deposita en una cápsula de platino.

En el caso de la calorimetría diferencial de barrido, DSC, el rango de trabajo es: 20-100 °C.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. OBTENCIÓN DE MICROCHIPS

1.1 Diseño e Impresión.

1.1.1. Impresión.

Los resultados de las distintas impresiones de chips en papel Resma-Scharlab por anverso y reverso se muestran en la Figura 16 donde se añadieron 5µl de disolución diluida de colorante y se calentaron a 165°C en estufa y durante 15 minutos. En los casos de impresión en una cara con fondo negro y grosor x8 la disolución de colorante inyectada circula correctamente por el papel después del tratamiento térmico sin fugas. Por otro lado, en las impresiones a doble cara con fondo negro y borde fino se observa como el colorante sólo pasa por la parte en la que no hay tóner por ninguna de las dos caras además, al no coincidir perfectamente por las dos caras la forma del chip por el desplazamiento de la impresión el tamaño del circuito disminuye por lo que el papel se satura de disolución produciendo escapes. Se puede concluir que los resultados de éxito fueron las impresiones donde solo hay tóner en una cara del papel de filtro ya que este penetra perfectamente formándose la barrera por todo el grosor del papel sin necesidad de reforzarlo por la otra cara con más tóner y evitando así el desfase en la impresión por ambas caras.



Figura 16: Resultados chips con distintas impresiones, imágenes de anverso y reverso.

1.1.2 Anchura de líneas

Se realizaron pruebas, sobre papel Resma-Scharlab, donde se modificó el espesor del trazado de líneas de tóner necesario para evitar las fugas de disolución del circuito. Las primeras pruebas con chips de grosor x4, x5 y x6 a los que se le había aplicado un tratamiento térmico de 165°C durante 15 minutos en estufa, se pueden ver en la Figura 17. En ella se aprecia una clara mejora al aumentar el grosor comparando. Además se observa que la composición del colorante influye en su 'escape'. Así el colorante azoico amarillo apenas presenta fugas.



Figura 17: Resultados chips con distintos grosores estufa

En el segundo estudio el tratamiento térmico se realizó en horno RO2 durante 16 minutos y a una temperatura de 165°C. La imagen presenta los resultados para grosores de x5, x6 y x7. Se observa que en los chips de mayor grosor, x7, no se produjo ninguna fuga y el funcionamiento fue correcto por otro lado en el caso de x6 se produjo sólo un pequeño escape con la disolución de colorante azul mientras que con grosor x5 hubo fugas en todos los casos, Figura18:

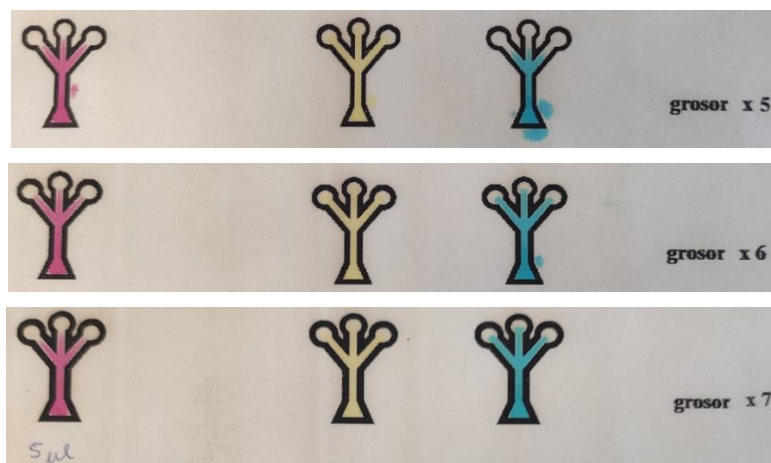


Figura 18: Resultados chips con distintos grosores horno RO2.

Se concluye que el grosor mínimo para tener un resultado efectivo de los chips debe ser de x6, (equivalente a 0,6mm) pero es preferible utilizar un grosor mayor reforzando el circuito y evitando escapes producidos tanto por la ineficacia de la barrera como por posibles imperfecciones de la impresión del tóner.

1.1.3 Papel de filtro

Otro factor importante a estudiar que afecta al funcionamiento de los circuitos es el tipo de papel de filtro empleado. Se hicieron pruebas con las mismas condiciones para Resma-Scharlab, Whatman de Grado 1 y Whatman de Grado 4.

En primer lugar se compararon resultados de Resma-Scharlab con Whatman 1 inyectando 7 μ l en chips de grosor x7 y aplicando calentamiento a 190°C en estufa durante 5 minutos. Se puede apreciar en la Figura 19 como en el papel Whatman 1 se producen más fugas, la disolución no es retenida por la barrera, mientras que en Resma aunque se produzca algún escape es mínimo en comparación.



Figura 19: Resultados papel Resma Scharlab-RS- y Whatman 1 –W- mismo tratamiento. Anverso y reverso de los papeles.

Por otro lado, se hizo un estudio de papel Whatman, Grado 1 y Grado 4 utilizando horno RO2 a 190°C con una rampa inicial de pre-tratamiento de 30s a 160°C y mantenimiento (5 min) 300s a 190°. Se obtuvo que el Whatman 4 dio mejor resultado con el diseño de fondo negro mientras que con fondo blanco se produjeron fugas. En Whatman 1 ocurrió lo contrario, fue mejor el diseño con fondo blanco que con fondo negro pero en este caso la diferencia entre los dos diseños es pequeña.



Figura 20: Resultados Whatman 1 y 4 con mismo tratamiento.

1.2 Métodos de calentamiento

1.2.1 Estufa y Horno RO2

Como se explicó anteriormente el tóner está compuesto por polímeros en su mayoría teniendo el punto de reblandecimiento sobre los 165°C. Se utilizó esta temperatura para hacer un estudio del tiempo necesario de calentamiento para obtener buenos resultados con papel Resma-Scharlab e inyectando 5µl de disolución colorante en chips con borde negro. El primero fue empleando una estufa para el calentamiento con tiempos de 5, 10 y 15 minutos. En la imagen se puede observar como al aumentar el tiempo la barrera del chip es más efectiva, siendo la de 15 minutos la de mayor éxito.

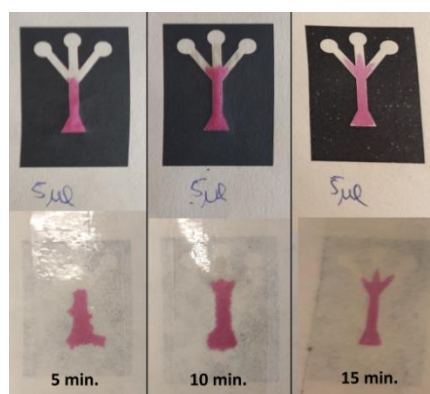


Figura 21: Resultados calentamiento estufa 165°C a distintos tiempos.

Otro estudio fue empleando un horno RO2 para el tratamiento térmico donde se obtuvo que para las mismas condiciones que con estufa, el tiempo mínimo necesario para obtener el resultado a 165°C fue de 10 minutos. La programación del horno fue de 30s y 127°C el primer calentamiento y 600s a 165°C el segundo. De esta forma se ahorran 5 minutos para obtener un buen resultado por lo que el Horno RO2 además de que se programa y no es necesario estar pendiente del tiempo es también más rápido que la estufa.



Figura 22: Resultado calentamiento RO2 10 minutos 165°C.

Se demostró que al aumentar la temperatura de calentamiento es necesario menos tiempo de tratamiento. Para emplear solo 5 minutos de calentamiento la temperatura mínima para papel Resma fue de 180°C con fondo negro y 190°C con borde fino usando el horno RO2. La rampa calentamiento horno RO2 a 180°C fue de 30s a 150°C y 300s a 180°C y para 190°C de 30s a 160°C y 190°C a 300s. Como se puede ver en la Figura 23 para las mismas condiciones la estufa necesita más tiempo o más temperatura de calentamiento. Con la estufa es necesaria una temperatura mínima de 190°C.



Figura 23: Resultados distintos tratamientos térmicos a 180°C.

En la tabla se resume el trabajo de los estudios realizados sobre distintos papeles, con diferentes programas de calentamiento e inyecciones de volumen diversos:

Calentamiento	T ^a	Tiempo (min)	Diseño	Papel	Volumen (μl)	Resultado
Estufa	165°C	5	Fondo negro	RS	5	Fugas
		10	Fondo negro	RS	5	Fugas
		15	x5	RS	5	Sin fugas
		15	x7	W1	7	Fugas
	180°C	5	x7	RS	5	Fugas
			x7	W1	5	Fugas
			x7	W4	5	Fugas
	190°C	5	x7	RS	7	Sin fugas
			x7	W1	7	Fugas
	195°	5	x8	RS	7	Sin fugas
			x8	W1	7	Sin fugas
		10	x8	W1	7	Sin fugas
Horno RO2	150°C	15	x9	W1	5	Fugas
	165°C	10	x7	RS	5	Sin fugas
		13	x6	RS	5	Sin fugas
		16	x6	RS	5	Sin fugas
		10	x7	W1	7	Sin fugas
	180°C	5	Fondo negro	RS	7	Sin fugas
			x7	W1	8	Fugas
			x7	W4	5	Fugas
	190°C	5	x7	RS	7	Sin fugas
			x7	W1	7	Fugas
			Fondo negro	W1	7	Sin fugas
				W4	7	Sin fugas
		10	x9	W1	7	Sin fugas
	195°C	5	x8	RS	7	Sin fugas
			x9	W1	5	Sin fugas
		10	x7	W1	7	Sin fugas
			Imp. Fac.	W1	3	Fugas
				W4	3	Fugas

Tabla 2: Resumen resultados chips experimentales.

1.2.2 Plancha-Calentamiento focalizado

Se realizaron tres tratamientos poniendo la superficie caliente de la plancha sobre el papel de filtro impreso con distintos tiempos de calentamiento del, 50s, 60s, y 70s, a una temperatura de 140°C en los tres casos. Los resultados fueron fallidos y no se apreció ningún efecto de la barrera del chip.



Figura 24: Resultado tratamiento con plancha.



Figura 25: Plancha térmica y termopar de medida de temperatura.

1.3 Otros: piro-grabación, imanes de Nd de alta imantación y corte.

1.3.1 Pirografía

Para este tratamiento del chip se utilizó un soldador-pirógrafo con punta metálica caliente. El proceso fue repasar el chip con la punta caliente del soldador-pirógrafo a distintas temperaturas como se indica en la figura 26. Al inyectar las disoluciones de colorante se pudo ver como la barrera del chip no profundizó en todo el papel. Si se apreciaron mejores resultados a la temperatura de 350 °C pero aun así no fueron considerados de éxito.



Figura 26: Pirografía a distintas temperaturas.

1.3.2 Tratamiento magnético con imán de Nd de alta imantación

Uno de los componentes del tóner es óxido de hierro. Se pensó que al usar un imán de Neodimio estas partículas de óxido de hierro que se encuentran en la superficie del papel al ser atraídas por el imán penetrarían en el papel de filtro produciendo la barrera del circuito, pero los resultados fueron fallidos.



Figura 27: Resultado tratamiento magnético.

1.3.3 Corte

En este caso se pega papel de filtro sobre una lámina de cobre y se realiza el corte mediante Plotter de corte de chapa. Esta metodología es similar a la preparación de chips en electrónica. Se logra imprimir la forma del chip en la lámina y el papel. Como se puede apreciar en la imagen la disolución circuló perfectamente por el papel ya que el circuito se encuentra totalmente aislado. Este resultado fue de éxito pero el trabajo para conseguirlo fue más laborioso que los métodos estudiados.



Figura 28: Chips recortados con y sin disolución.

2. CARACTERIZACIÓN

2.1 Análisis Térmico de tóner mediante: TGA y DTA

Se ha realizado un estudio del tóner de la marca Sharp mediante análisis Termo gravimétrico, TGA y DTA, además, a los valores de TGA se aplica calculo diferencial ($d(m)/d(T)$). Los resultados de TGA se muestran a continuación:

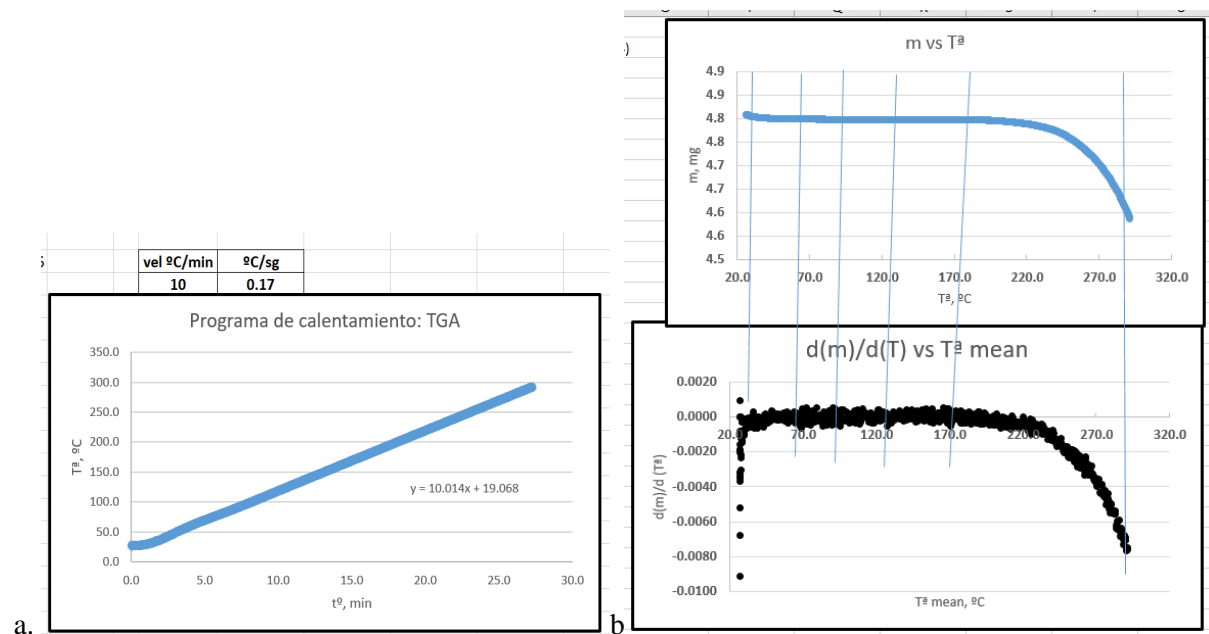


Gráfico 2: Análisis TGA y diferencial. (a) Programa de calentamiento. (b) Perfiles de los termogramas.

El análisis TGA se llevó a cabo con el programa de calentamiento que se describe:

Tª inicial: 27 °C hasta 295 °C con velocidad de calentamiento 10°C/min.

Los resultados en el TGA permiten identificar una pérdida inicial sobre 27°C y la descomposición final a 292 °C.

En la diferencial de la curva anterior, $d(m)/d(T)$ vs. Tª mean (de los intervalos), se identifican claramente los picos de los dos procesos anteriores y también picos más pequeños sobre 70, 96, 120 y

170 °C. La pequeña magnitud de las señales se justifica por el bajo porcentaje de los compuestos en la mezcla del tóner.

El resultado del DTA (diferencia de T^a entre la muestra y una referencia) aporta información de interés que se manifiesta más claramente en la representación diferencial, Gráfico 3.

En la misma se identifican claramente transiciones a 41, 74, 125, 175 y 243 °C. Las señales a 41 y 243 °C son positivas, y pueden identificarse con procesos de cristalización (41°C) y oxidación (243°C). La señal a 175 °C se ha descrito como la temperatura de fusión del material polimérico del tóner empleado, señalándose esta como la temperatura mínima a alcanzar para lograr la permeación del tóner en el espesor del papel, lo cual permite su identificación. A 74°C también se observa una señal de fusión que puede ser debida al reblandecimiento de las ceras.

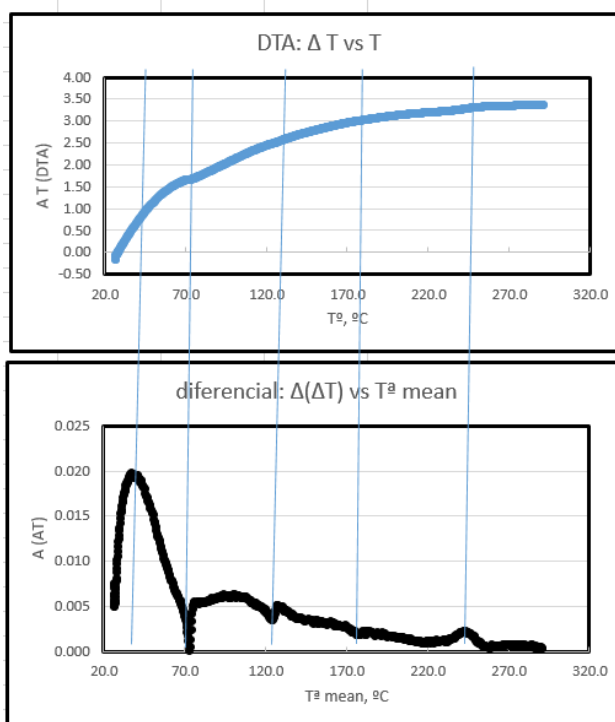


Gráfico 3: Análisis térmico diferencial: DTA y diferencial de DTA.

También se realizó el estudio mediante calorimetría de barrido diferencial, DSC, en la Gráfico 4 se observa el resultado.

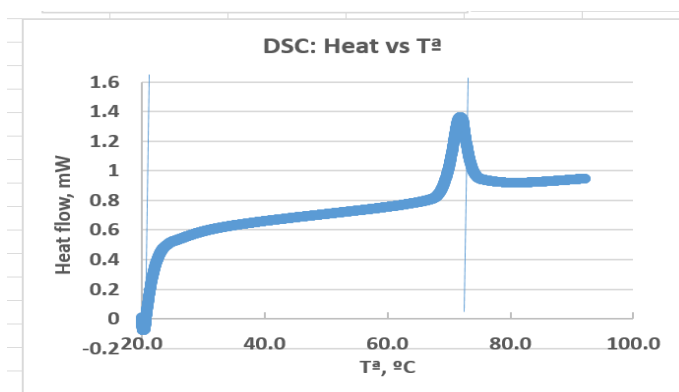


Grafico 4: DSC

Los resultados en el rango 20-100°C demuestran dos picos a temperaturas de 21 y 72°C. Los valores son compatibles con procesos de transición vítrea (21 °C) y fusión (72°C). Estos valores son coincidentes con lo que se ha observado en TGA y principalmente DTA.

2.2 Profundización del tóner con microscopía   ptica

Se ha llevado a cabo un estudio de la profundización del tóner sobre papel de filtro Resma-Scharlab tras un proceso de impresión. Se ha evaluado si el tratamiento térmico influye en la profundización. Así mismo se ha realizado la impresión y re-impresión a doble cara, ajustando las condiciones para que se superponga en el anverso y reverso la impresión.

En las siguientes figuras se muestran los resultados. En el estudio se ha imprimido el diseño de chips sobre fondo negro, siendo el chip blanco. El tratamiento térmico fue de 15 minutos a 170  C en estufa.

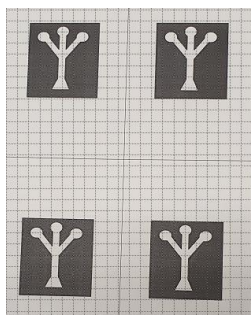


Figura 29: Imagen caracterizada. Perfil y secciones cortadas



Figura 30: Sección del canto de papel que muestra la profundidad del tóner tras una impresión sin tratamiento térmico. (a) Resolución 200   m. (b) Resolución ampliada a 100   m

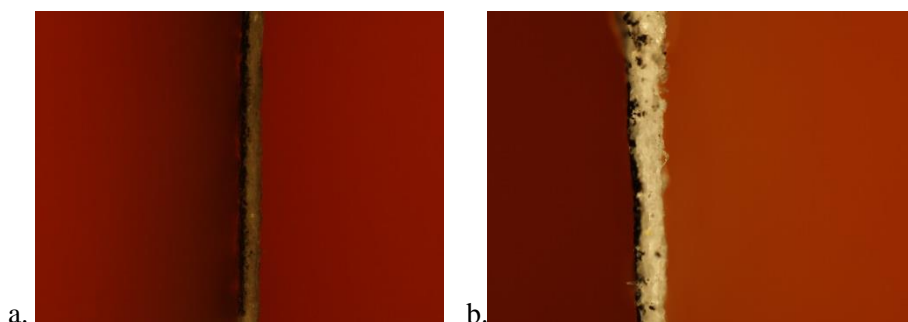


Figura 31: Sección del canto con profundización del tóner para una impresión a una cara con tratamiento térmico. (a) Resolución 200   m. (b) Resolución ampliada a 100   m.

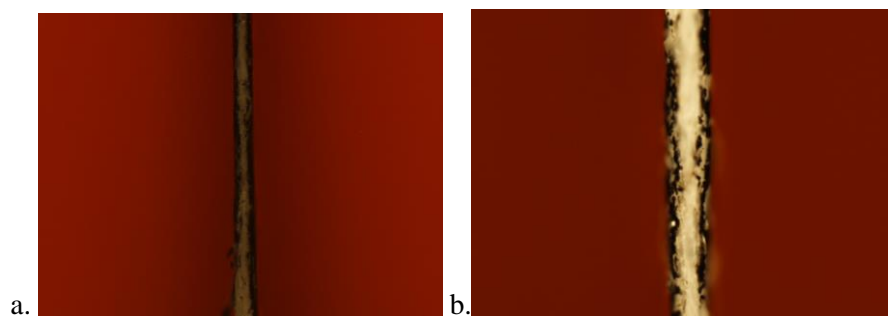


Figura 32: Sección del canto con profundización del tóner para una impresión a doble cara: anverso-reverso con tratamiento térmico. (a) Resolución 200 μm . (b) Resolución ampliada a 100 μm .

Medida (4x10)	Grosor papel (mm)	Grosor tóner (mm)	Grosor total (mm)
Solo papel	0.07	-	0.07
Imp. 1 cara sin tratamiento.	0.06	0.02	0.08
Imp. 1 cara con tratamiento térmico.	0.04	0.03	0.07
Imp. 2 caras con tratamiento térmico.	0.04	0.02-0.02	0.08

Tabla 2: Medida grosor papel y tóner con Image J.

Los resultados han permitido evidenciar la profundización del tóner sobre el papel. Se puede apreciar en la Tabla 2 la diferencia en la penetración al aplicar tratamiento térmico ya que sin tratamiento el tóner queda en la superficie del papel mientras que al calentar penetra dentro de este.

2.3 Flujo capilar de una disolución mediante el modelo de “Lucas-Washbrun”.

Para realizar el estudio se inyectaron 7 μl de disolución de colorante azul en papel Resma-Scharlab con calentamiento en estufa a 165°C durante 15 minutos en un chip con espesor de línea x9.

La ecuación para el flujo capilar de ‘Lucas-Washbrun’ se muestra a continuación la cual ha sido explicada anteriormente en la introducción. El tiempo de ascensión por capilaridad en el chip fue de 1,24 minutos donde el recorrido del chip es de 2,50 mm.

L = Recorrido (m).

γ = Tensión superficial (kg/s^2).

μ =Viscosidad ($\text{kg/m}\cdot\text{s}$).

r = Diámetro efectivo del canal (m).

t = tiempo de recorrido (s).

φ = Angulo de inyección disolución.

$$L = \sqrt{\frac{\gamma r t \cos(\varphi)}{2 \mu}} = A \sqrt{t}$$

$$2,5 \cdot 10^{-3} \text{m} = \sqrt{A \cdot 84 \text{s}} \rightarrow A = 7,44 \cdot 10^{-8} \text{m}^2/\text{s}$$

Se puede establecer una relación entre el tiempo necesario para recorrer el chip y su longitud suponiendo los demás parámetros constantes para la misma disolución de colorante, recogiendo estos dentro de la constante llamada A (m^2/s). Durante los experimentos se observó cómo cada disolución de colorante tiene distintas propiedades comportándose de forma diferente al inyectarse en el chip por lo que el valor de la constante A y por tanto de los parámetros que esta engloba depende de cada tipo de colorante utilizado.

2.4 Lectura cromogénica mediante IMAGE J

La lectura de colores utilizando Image J se hizo usando papel Whatman 1 con un tratamiento térmico de 10 minutos a 195°C en horno RO2 y estufa. La medida del color en la migración de los colorantes azoicos de referencia en las zonas ROIs y la medida de blanca del papel de filtro se presentan en los diagramas de barras siguientes:

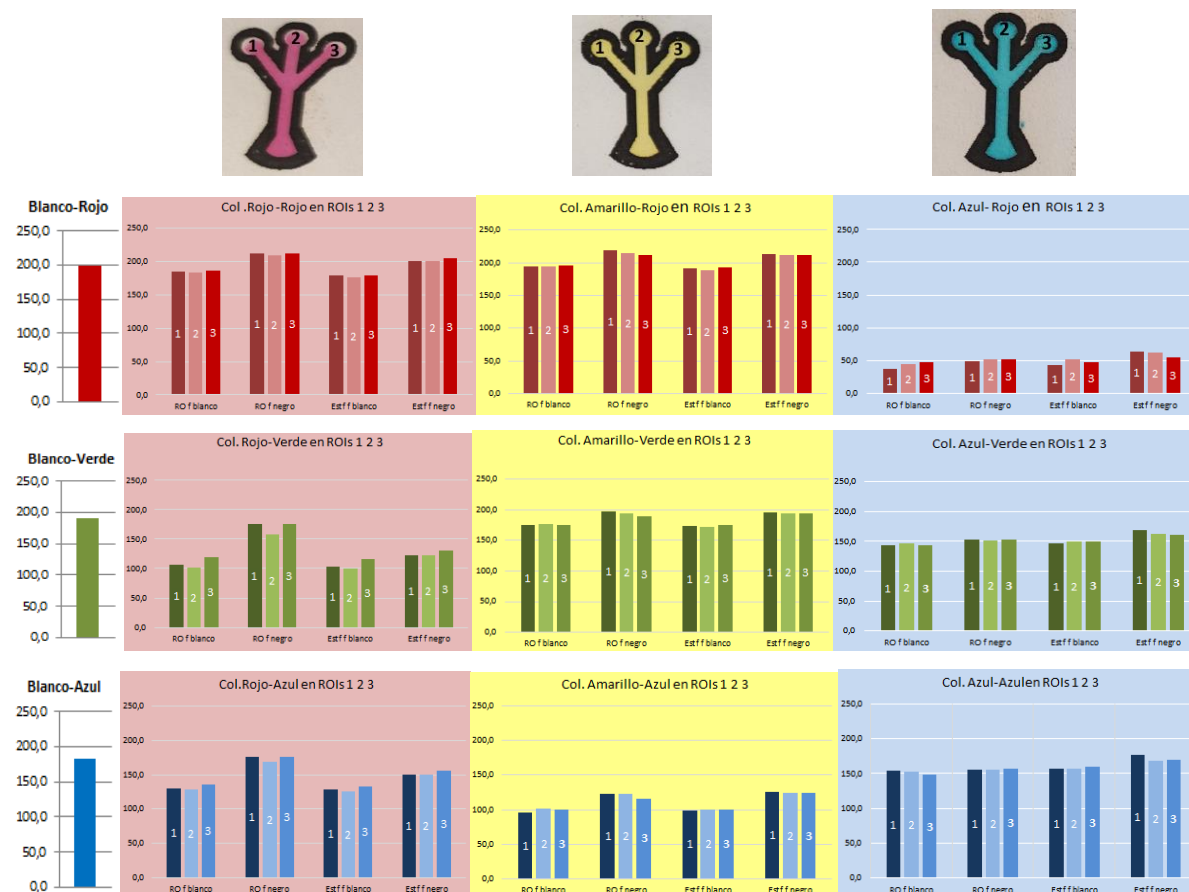


Gráfico 5: Medida RGB de ROIs con Image J.

A partir de estos gráficos se obtiene que hay más diferencia de luminosidad en los chips con fondo blanco respecto a los de fondo negro comparando con el blanco de referencia del papel. Se podría decir que el efecto del colorante es mayor en chips con fondo blanco y por tanto llega más disolución de colorante a los ROIs.

Por otro lado, también se puede observar como hay un ligero aumento de luminosidad en los ROIs laterales, 1 y 3, por lo que no llega la misma cantidad de disolución de colorante a todos los ROIs del chip.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA

1. CONCLUSIÓN

Como conclusiones se destaca:

- La forma más rápida, económica y efectiva de conseguir un circuito de microfluídica sobre papel estudiada es sometiendo un papel de filtro con el diseño del chip impreso a un tratamiento térmico en un horno o estufa.
- Únicamente es necesaria la impresión del chip sobre una cara del papel de filtro ya que el tóner profundiza en todo el espesor del papel aunque solo se aprecie con microscopio una parte debido a que el material polimérico que forma la barrera hidrofóbica es incoloro.
- La anchura mínima de línea del chip debe ser de 0,6 mm para evitar fugas siendo conveniente emplear una anchura mayor para tener un mayor refuerzo.
- Se obtiene que hay una relación tiempo-temperatura del tratamiento térmico necesario para obtener una barrera del circuito efectiva donde también influye el tipo de papel de filtro empleado.
- Se ha hecho un estudio de la caracterización donde por análisis térmico se obtiene la temperatura mínima de calentamiento para la fusión del polímero. Se ha comprobado la profundización del tóner por microscopía óptica al realizar un tratamiento térmico. A partir del modelo de ‘Lucas-Washbrun’ se ha relacionado el recorrido de una disolución con el tiempo necesario para efectuarlo por capilaridad. Por último, el tipo de borde empleado afecta a la cantidad de disolución presente en los ROI así como la posición de estos en el chip.

2. BIBLIOGRAFÍA

¹ Lopez-Molinero, A.; Liñan, D.; Sipiera, D.; Falcon, R.; *Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics*; Microchemical Journal 2010, 96, 380–385; DOI:10.1016/j.microc.2010.06.013.

² Suberviola, M.; *Detection and differentiation of biogenic amines by spectroscopic and digital image techniques*; Trabajo fin de Grado, Universidad de Zaragoza, Fac. Ciencias, 2019.

³ Petryayeva, E.; Russ Algar, W. ;*A job for quantum dots: use of a smartphone and 3D-printed accessory for all-in-one excitation and imaging of photoluminescence*; Anal Bioanal Chem 2016, 408:2913–2925; DOI: 10.1007/s00216-015-9300-3.

⁴Yi-Qiang, F.; Hong-Liang, W.; Ke-Xin, G.; Jing-Ji, L.; Dong-Ping, C.; Ya-Jun,Z.; *Applications of Modular Microfluidics Technology*; Chinese Journal of Analytical Chemistry 2018, 46, Issue 12; DOI: 10.1016/S1872-2040(18)61126-0.

⁵Duangdeewonga, C.; Sitanurakb, J.; Wilairatb, P.; Nacaprichab, D.; Teerasong, S.; *Microfluidic paper-based analytical device for convenient use in measurement of iodate in table salt and irrigation water*; Microchemical Journal 2020 , 152, 104447; DOI: 0.1016/j.microc.2019.104447.

- ⁶ Noviana, E.; Blascke Carrão, D.; Pratiwi, R.; Henry, C.S.; *Emerging applications of paper-based analytical devices for drug analysis: A review*; Analytica Chimica Acta 2020, 1116, 70-90; DOI:10.1016/j.aca.2020.03.013.
- ⁷ Fu, L-M.; Wang, Y-N.; *Detection methods and applications of microfluidic paper-based analytical devices*; Trends in Analytical Chemistry 2018, 107, 196-211; DOI: 10.1016/j.trac.2018.08.018.
- ⁸ Sitanurak, J.; Fukana, N.; Wongpakdee, T.; Thepchuay, Y.; Ratanawimarnwong, N.; Amornsakchai, T.; Nacapricha, D.; *T-shirt Ink for One-Step Screen-Printing of Hydrophobic Barriers for 2D- And 3D-microfluidic Paper-Based Analytical Devices*; Talanta 2019, 205, 120113; DOI:10.1016/j.talanta.2019.120113.
- ⁹ Jemmeli, D.; Marcoccio, E.; Moscone, D.; Dridi, C.; Arduini, F.; *Highly sensitive paper-based electrochemical sensor for reagent free detection of bisphenol A*; Talanta 2020, 216: 120924 ; DOI: 10.1016/j.talanta.2020.120924.
- ¹⁰ Curto, V.F.; Lopez-Ruiz, N.; Capitan-Vallvey, L. F.; Palma, A. J.; Benito-Lopez, F.; Diamonda, D.; *Fast prototyping of paper-based microfluidic devices by contact stamping using indelible ink*; RSC Advances 2013, 3, 18811–18816; DOI: 10.1039/c3ra43825b.
- ¹¹ Ghosh, R.; Gopalakrishnan, S.; Savitha, R.; Renganathan, T.; Pushpavanam, S.; *Fabrication of laser printed microfluidic paper-based analytical devices (LP-μPADs) for point-of care applications*; Nature, Scientific Reports 2019, 9:7896; DOI: 10.1038/s41598-019-44455-1.
- ¹² Bazrafshana, Z.; Ataefarda, M.; Nourmohammadian, F.; *Modeling the effect of pigments and processing parameters in polymeric composite for printing ink application using the response surface methodology*; Progress in Organic Coatings 2015, 82, 68–73; DOI:10.1016/j.porgcoat.2015.01.004.
- ¹³ Navarro, J.; Sanz-Vicente, I.; Lozano, R.; Rivero, I.; López, A.; De Marcos, S.; Galbán, J.; *Hacia la determinación in situ de aminos biógenas*; Grupo de Biosensores Analíticos (GBA), Universidad de Zaragoza, Fac. de Ciencias, 2017.
- ¹⁴ Sanz-Vicente, I.; López-Molinero, A.; de Marcos, S.; Navarro, J.; Cebrián, P.; Arruego, C.; Visiedo, V.; Galbán, J.; *Smartphone-interrogated test supports for the enzymatic determination of putrescine and cadaverine in foods*; Anal.Bioanal Chem 2020; DOI:10.1007/s00216-020-02677-7.